

JP05344893A

MicroPatent Report

GENE CAPABLE OF CODING ACETOHYDROXY ACID SYNTHASE AND ITS UTILIZATION

**[71] Applicant: MITSUBISHI
PETROCHEM CO LTD**

[72] Inventors: INUI MASAYUKI;
KOBAYASHI MIKI;
YUGAWA HIDEAKI

[21] Application No.: JP04153886

[22] Filed: 19920612

[43] Published: 19931227

[illegible]

Go to Fulltext

[57] Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject gene DNA, isolated from a coryneform bacterium such as *Brevibacterium.flavum* MJ-233, having a specific base sequence and capable of providing a transformant remarkably improved in productivity of L-isoleucine, L-valine, etc. **CONSTITUTION:** *Brevibacterium.flavum* MJ-233 which is a corynebacterium is cultured in a culture medium till the latter period of the logarithmic growth phase and the microbial cell is collected and suspended in a buffer solution containing a lysozyme. Proteinase K(R) and sodium dodecyl sulfate are then added to carry out the lysis. The resultant lysate is subsequently extracted with a phenol/chloroform solution. Ethanol is added to the extract solution to recover a DNA, which is then treated with a restriction enzyme, bound to a cloning vector and inserted into *Escherichia coli* to perform transformation. The obtained transformant is subsequently cloned to sort out a positive clone. A plasmid is recovered from the obtained strain and treated with a restriction enzyme to afford the objective gene DNA, capable of coding an acetohydroxy acid synthase derived from the coryneform bacterium and expressed by the formula, etc.**COPYRIGHT:** (C)1993, JPO&Japio

[51] Int'l Class: C12N01560 C12N00121 C12P01306 C12P01308
C12N01560 C12R00113 C12N00121 C12R00113 C12P01306 C12R00113
C12P01308 C12R00138

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-344893

(43)公開日 平成5年(1993)12月27日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/60	Z N A			
1/21		7236-4B		
// C 1 2 P 13/06	C	8931-4B		
13/08	D	8931-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-153886

(22)出願日 平成4年(1992)6月12日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 乾 将行

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 山本 隆也

(54)【発明の名称】 アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA及びその利用

(57)【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233からアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を単離し、この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 このアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-AHASのL-イソロイシン又はL-バリンの産性能は著しく増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フ

ラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

```

ATGACAGGTG CACAGGCAAT TGTTGATCG CTCGAGGAGC TTAACGCCGA CATCGTGTTC 60
GGTATTCTCG GTGGTCCGGT GCTACCGGTG TATGACCCGC TCTATTCTCT CACAAAGGTG 120
CGCCACGTCT TGGTGCCCA CGAGCAGGGC GCAGGCCACG CAGCAACCGG CTACGGCGAG 180
GTACTGGAC GCGTTGGCGT CTGCATTGCA ACCTCTGGCC CAGGAGCAAC CAACTTGGTT 240
ACCCCAATCG CTGATGCAAA CTTGGACTCC GTTCCATGG TTGCCATCAC CGGCCAGGTC 300
GGAAGTGGCC TGCTGGTAC CGACGCTTTC CAGGAAGCCG ATATCCCGCG CATCACCATG 360
CCAGTGACCA AGCACAACCT CATGGTCACC GACCCCAAG ACATTCCACA GGCATTGGCT 420
GAGGCATTCC ACCTCCGAT TACTGGTCGC CCTGGCCCTG TTCTGGTGA TATTOCTAAG 480
GATGTCCAGA ACGCTGAATT GGATTTCGTC TGGCCACCA AGATCGACCT GCGAGGTAC 540
CGCCAGTTT CAACACACA TGCTGCCAG ATCGAGCAG CAGTCAAGCT GATCGGTGAG 600
GCCAAGAAGC CGCTCCTTA CGTTGGAGGC GCGCTTATCA AGGCTGACG ACACGAAGAG 660
CTTCGTGGT TCGTGAGTA CAOCGGCATC CCAGTTGTCA CCACCTGAT GCGTTGGGT 720
ACTTTCAG AGTCTACGA GCTGCACATG GGTATGCCAG GCATGCATGG CACTGTGTCC 780
GCTGTGGTG CACTGCAGG CAGGACCTG CTGATTGCTA TCGCTCCCG CTTTGATGAC 840
CGCGTACCG GTGACGTGA CAOCTTCGG CCTGACGCA AGATCATTCA CGCCGATATT 900
GATCTGCGG AATCGGAAA GATCAAGCAG GTTGAGGTTT CAATCGTGG CGATGCCCG 960
GAAGTTCTTG CTGCTCTGT GGAACACAC AAGGCAAGCA AGGCAGAGC CGAGGACATC 1020
TCCGAGTGG TTGACTACCT CAAGGGCTC AAGGCAGTT TCCACGTGG CTACGACGAG 1080
CAGCCAGCG ATCTGCTGC ACCACAGTT CTCATTGAAA CCTGTCCAA GGAAGTTGGC 1140
CCCGAAGCA TTTACTCGC CGCGTGGG CAGCACCAA TGTGGGAGC TCAGTTGGTT 1200
GACTTTGAAA AGCCAGCAC CTGGCTCAAC TCCGTGGAC TGGGCAOCAT GGGCTAOGCA 1260
GTTCTGCGG CCTTGGAGC AAAGGCTGG GCACCTGACA AGGAAGTCTG GGCTATOGAC 1320
GGCGACGGCT GTTTCAGAT GACCAACCAG GAACTACCA CGCCCGCAGT TGAAGTTTC 1380
CCCATTAAGA TCGACTAAT CAACAACGA AACCTGGCA TGGTTGCCA ATGGCAGACC 1440
CTATTCTATG AAGGACGTA CTCAATACT AAATTGTA ACCAGGGCA GTACATGCCC 1500
GACTTTGTTG CCTTTCTGA GGAAGTGGC TGTGTGCCA TCCGCTCAC CAAAGCGGAG 1560
GAAGTACTGC CAGCCATCA AAAGGCTGA GAAATCAAG ACCGCCAGT AGTCATOGAC 1620
TTCATGCTG GTGAAGAGC ACAGGTATG CCAATGGTG CTGCTGGATC ATCCAACCTC 1680
GATATOCAGT ACGCACTCG ATTGCGOCCA TTCTTGAGC GCGACGAATC AGCTGCAGAA 1740
GACCTGCGAG ACATTATGC TTCCGTTGAT TCGACCGAGG CATAA 1785

```

で示されるアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

```

Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala
 1           5           10          15
Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp
          20          25          30
Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu
          35          40          45
Gln Gly Ala Gly His Ala Ala Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg
          50          55          60
Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
          65          70          75          80
Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile
          85          90          95
Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
          100          105          110

```

Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met
 115 120 125
 Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His
 130 135 140
 Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys
 145 150 155 160
 Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp
 165 170 175
 Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu
 180 185 190
 Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val
 195 200 205
 Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe
 210 215 220
 Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly
 225 230 235 240
 Thr Phe Pro Glu Ser His Glu Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His
 245 250 255
 Gly Thr Val Ser Ala Val Gly Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile
 260 265 270
 Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr
 275 280 285
 Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu
 290 295 300
 Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg
 305 310 315 320
 Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu
 325 330 335
 Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala
 340 345 350
 Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro
 355 360 365
 Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile
 370 375 380
 Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val
 385 390 395 400
 Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr
 405 410 415
 Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro
 420 425 430
 Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr
 435 440 445
 Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile
 450 455 460
 Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr
 465 470 475 480
 Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly
 485 490 495
 Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val Ala Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val
 500 505 510

Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys
515 520 525
Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly
530 535 540
Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser
545 550 555 560
Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu
565 570 575
Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala Asp Ile His Ala Ser Val Asp Ser Thr
580 585 590
Glu Ala

で示されるアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (E. C. 4. 1. 3. 18) をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来の遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌を用いるL-イソロイシン又はL-バリンの製造法に関する。

【0002】 L-イソロイシン及びL-バリンは必須アミノ酸の1つであり、人間及び動物の栄養上重要な役割をするアミノ酸として、医薬、食品、飼料添加剤に配合されており、その需要が近年急激に増加しつつある。

【0003】

【従来の技術】 L-イソロイシンは、他のアミノ酸の場合と同様に立体異性が存在する為、L体のみ化学合成することは一般に困難であり、工業的には主に醗酵法により生産が行われている。醗酵法による生産としては、例えばD- α -アミノ酪酸、スレオニン等のL-イソロイシンの前駆物質を使用する方法 (特公昭43-8709号、同40-2880号公報等参照)、前駆物質を特に加えない所謂直接醗酵法 (特公昭38-7091号公報、特開昭49-93586号公報等参照) 等の技術が開示されている。

【0004】 一方、L-イソロイシンの醗酵法による生産としては、例えば、アンモニウムイオン又はイソロイシン以外のL-若しくはD- α -アミノ酸の存在下に、D-、L-、又はD- α -ケト- β -メチル吉草酸からL-イソロイシンを製造する方法 (特公昭46-29789号公報参照)；アンモニウムイオン又はイソロイシン以外のL-若しくはD- α -アミノ酸の存在下に、D-

イソロイシンあるいはD- α -イソロイシンの単独もしくは混合物、又はこれらとその光学異性体との適宜混合物を変換せしめてL-イソロイシンを製造する方法 (特公昭46-29788号公報参照)；セラチア (Seratia) 属細菌の固定化物を用いてグルコースとD-スレオニンからL-イソロイシンを製造する方法 (日本醗酵工業大会講演要旨集p. 47~48、昭和52年度) 等が報告されている。

【0005】 しかしながらこれらの方法は、原料費が高む、収率が低い等の問題があり、十分に満足しうるものではない。また、L-バリンの工業的製法としては、L-イソロイシンの場合と同様に立体異性体が存在するので、化学合成法ではL-体のみの製造は困難であり、主として醗酵法によっている。しかしながら、公知の醗酵法によるL-バリンの製法では、対糖収率が低いことや、L-バリンの蓄積に限界があるため、新たな観点でL-バリンを効果的に生成せしめる方法の提供が強く望まれていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸シンターゼ (E. C. 4. 1. 3. 18) をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌染色体よりアセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造しうることを見出し本発明を完成するに至った。

【0008】 かくして、本発明によれば、(1) コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA、(2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド、(3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び(4) 該形質転換さ

れたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-イソロイシン又はL-バリンを製造する方法が提供される。

【0009】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子DNA」は α -ケト酪酸にビルビン酸を付加して α -アセト- α -ヒドロキシ酪酸を合成する酵素、あるいは、ビルビン酸2分子から α -アセト乳酸を合成する酵素、すなわちアセトヒドロキシ酸シンターゼ (E. C. 4. 1. 3. 18) をコードする遺伝子DNAを意味する。

【0010】アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後は合成することも可能であるが、一般にはアセトヒドロキシ酸シンターゼ生産性を有する微生物からクローニングすることができ、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0011】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである：A断片は、上記コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0012】まず、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0013】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399 (宝酒造製) に挿入し、このベクターを用いてアセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子が欠損したイソロイシン及びバリン要求性大腸菌変異株

エシェリヒア・コリM1262 [エシェリヒア・コリジェネテック・ストックセンター (Escherichia coli Genetic Stock Center)、デパートメント・オブ・バイオロジー、エール・ユニバーシティ (Department of Biology, Yale University) ; P. O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U. S. A. 保存菌株] を形質転換し、選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0014】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により前記イソロイシン及びバリン要求性大腸菌変異株に導入し、選択培地に塗抹する。

【0015】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより、挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素SacIで切断することによって得られる大きさが約3.4 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0016】この約3.4 kbのアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0017】

【表1】

制限酵素		認識部位数		切断断片の大きさ (kb)			
KpnI	1	1.75	1.65				
NcoI	2	1.7	0.95	0.75			
EcoRV	2	1.8	1.3	0.3			
EcoO65I	3	1.65	1.55	0.15	0.05		

【0018】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完成分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0019】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合に

は、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (ϕ x 174 phage) のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリ

ルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0020】一方、上記したプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素EcoRI、SacIによって切断することにより得られる大きさが約3.4 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118及びまたはpUC119（宝酒造製）を用いるジデオキシヌクレオチド終末法（dideoxy chain termination法、Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977）により決定することができる。このようにして決定した上記約3.4 kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子は、後記する配列表の配列番号：1に示す配列を有するものであり、594個のアミノ酸をコードする1782塩基対から構成されている。

【0021】上記した、後記配列表の配列番号：1に示す塩基配列を包含して成る本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベクマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0022】また、前記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0023】以上に詳述した大きさが約3.4 kbのDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）は、適当なプラスミドベクター、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアセトヒドロキシ酸シンターゼの高発現可能な組換えプラスミドを得るこ

とができる。

【0024】また、本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターは、コリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アセトヒドロキシ酸シンターゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であれば、いかなるプロモーターであつてもよい。

【0025】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0026】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0027】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレバクテリウム・スタチオニス（*Brevibacterium stationis*）IFO12144（FERM BP-2515）からプラスミドpBY503（このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照）DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298（宝酒造製）のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0028】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えば、プラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを

必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0029】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約3.4kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-イソロイシン及びL-バリンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-AHASと命名した。プラスミドpCRY30-AHASの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0030】このようにして造成されるアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-イソロイシン及びL-バリンを安定に効率よく生産することが可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41(FERM BP-1498)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11(FERM BP-1500)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21(FERM BP-1499)等が挙げられる。

【0031】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール酸化性微生物である(特開昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERMBP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0032】これらの微生物の他に、プレバクテリウム・アンモニアゲネス(*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746;プレバクテリウム・デバリカタム(*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020;プレバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevi*

bacterium lactofermentum) ATCC13869;コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0033】なお、宿主としてプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502(特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である[Bact. Rev., 36, p. 361~405(1972)参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0034】宿主プレバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度:0.2~50 μ g/ml)もしくはエチジウムブロミド(濃度:0.2~50 μ g/ml)等を含む培地に、1ml当たり約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら、約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0035】このようにして得られるプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように[Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796(1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293(1988)参照]、DNA受容菌へのパルス波通電[Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159(1990)参照]によりプラスミドを導入することが可能である。

【0036】上記の方法で形質転換して得られるアセトヒドロキシ酸シンターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノー

ル、蔗糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養源を培地に添加することができる。

【0037】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20～約40℃、好ましくは約25℃～約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5～10、好ましくは7～8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1～5容量%、更に好ましくは2～3容量%である。また、培養期間は通常1～7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0038】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-イソロイシン又はL-バリン生成反応に使用することができる。L-イソロイシン又はL-バリン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物又はそれから分離された粗酵素もしくは精製酵素として、あるいは適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物、粗もしくは精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0039】しかして本発明に従えば、上記培養菌体又は菌体処理物の存在下に、少なくとも炭素源と窒素源を含有する水性反応液中にて酵素反応させてL-イソロイシン又はL-バリンを生成せしめることを特徴とするL-イソロイシン又はL-バリンの製造法が提供される。上記の酵素反応は、通常約20～約40℃、好ましくは約25～約35℃の範囲内で行うことができる。

【0040】水性反応液中に添加することができる炭素源、窒素源は、前記した通常の栄養培地に用いられるものを挙げることができる。また該水性反応液には、前記した通常の栄養培地に用いることができる無機塩等を添加することもできる。特に、本発明のプラスミドで形質転換しうる宿主微生物がビオチン要求性のコリネ型細菌である場合は、上記の如く調製された培養菌体またはその固定化物と、少なくとも炭素源と窒素源とを含有しかつビオチンを含有しない水性反応液中で、酵素反応させてL-イソロイシン又はL-バリンを生成せしめるのが好適である。この場合、ビオチン要求性のコリネ型細菌はビオチンを実質的に含有しない水性反応液中では菌体増殖せずに、該菌体の保有する代謝系において炭素源及び窒素源がエネルギー共役を伴う酵素反応を介して反応せしめられ、L-イソロイシン又はL-バリンが製造され

る。

【0041】しかして本発明に従えば、(1)上記培養菌体又はその固定化物の存在下に、少なくともエタノールと酪酸誘導体をビオチンを含有しない水性反応液中にて酵素反応させてL-イソロイシンを生成せしめることを特徴とするL-イソロイシンの製造法、(2)上記培養菌体又はその固定化物の存在下に、少なくともグルコースを含有する水性反応液中にて酵素反応させてL-バリンを生成せしめることを特徴とするL-バリンの製造法が提供される。

【0042】上記した、本発明に従う水性反応液は、ビオチンを実質的に含有しない水あるいはリン酸またはトリス塩酸等の緩衝液であることもできるが、好ましくはビオチンを含有しない合成培地が用いられる。この合成培地には、酵母エキス、ペプトン、コーンステープリカー等の天然栄養物質を含まない化学構造が既知の無機窒素源及び/又は無機物を含有する水溶液が包含される。本発明において用いうる合成培地の無機窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等を例示することができ、また、無機物としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸鉄等を例示することができる。これらの無機窒素源および無機塩はそれぞれ、単独または2種以上混合して用いることができる。

【0043】本発明に従うL-イソロイシン又はL-バリンの製造法において用いられる合成培地の一例を示すと次のとおりである： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/l； KH_2PO_4 0.5g/l； K_2HPO_4 0.5g/l； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l； $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20ppm； $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20ppm含有するpH7.6の水溶液。

【0044】本発明のL-イソロイシン又はL-バリン製造法において使用される前記のようにして調製された培養菌体又は菌体処理物の使用量は、特に制限されるものではないが、培地の容量を基準にして一般に1～50% (wt/vol)、好ましくは2～20% (wt/vol)の範囲内の濃度で使用することができる。上記したとおりの組成を有する水性反応液中における培養菌体又は菌体処理物を用いる酵素反応は、一般に約20～約50℃、好ましくは約30～約40℃の温度で通常約10～約72時間行うことができる。

【0045】本発明に従うL-イソロイシンの製造法においては、上記したビオチンを含有しない水性反応液中にて、エタノールと酪酸誘導体と窒素源とが酵素反応せしめられL-イソロイシンが生成される。L-イソロイシン製造に際しての、水性反応液中のエタノールの濃度は通常0.5～40容量%、好ましくは1～20容量%の範囲内とすることができる。水性反応液中の酪酸誘導体としては、例えば、DL- α -アミノ酪酸、 α -ケト

酪酸又はそれらの塩類を挙げることができる。水性反応液中の酪酸誘導体の濃度は、通常0.1~20% (wt/vol) の濃度範囲で使用するのが適当であるが、特に α -ケト酪酸又はその塩を使用する場合は、反応液中の濃度が常に0.3% (wt/vol) を越えずに添加すると、副生物であるノルバリンの生成を低減し、 γ -イソロイシンの収率も向上させることができる。上記した反応基質の添加は、上記濃度を越えないかぎり連続的に行ってもよく、あるいは間欠的に行ってもよい。反応に使用される上記した酪酸誘導体の塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩類；カルシウム等のアルカリ土類金属塩類；アンモニウム塩等が挙げられ、それらの中でもナトリウム塩が好適である。

【0046】また、本発明に従う γ -イソロイシンの製造法においては、上記したピオチンを含む水性反応液中にて、グルコースと窒素源とが酵素反応せしめられ γ -イソロイシンが生成される。 γ -イソロイシン製造に際しての、水性反応液中のグルコース濃度は、通常0.1~5.0重量%の範囲内とすることができる。グルコースは反応中上記範囲内の濃度に維持されるように連続的または間欠的に水性反応液に添加するのが好ましい。

【0047】かくして製造される γ -イソロイシン又は γ -イソロイシンの水性反応液からの分離、精製は、それ自体既知の通常用いられる方法に従って行なうことができ、例えば、イオン交換樹脂処理法、晶析法等の方法を適宜組合せて行うことができる。

【0048】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例1

プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のクローニング

【0049】(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピオチン200 μg 、塩酸チアミン200 μg 、グルコース20g、蒸留水11〕11に、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液 (pH8.0) -1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.

5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 $\times g$ 、20分間、10~12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液 (pH7.5) -1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0050】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90 μl を制限酵素EcoRI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399 (宝酒造より市販) を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及び T_4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0051】(C) アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜は、大腸菌変異株エシェリヒア・コリMI262を用いて行った。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリMI262を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g、ロイシン20mg、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水11に溶解] に塗抹した。

【0052】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約5.8kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpHSG399-AHASと命名した。

【0053】(D) アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のサブクローニング

上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AHASに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119 (宝酒造より市販) アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子

を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0054】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AHASを制限酵素EcoRI、SacIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SacIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂及びT₄DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0055】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリMI262を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地[K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.1g、グルコース20g、ロイシン20m

g、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水11に溶解]に塗抹した。

【0056】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約3.4kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約3.4kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0057】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0058】

【表2】

表2 プラスミドpUC119-AHAS

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
KpnI	2	4.85 1.75
NcoI	2	5.65 0.95
EcoRV	2	5.25 1.35

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC119-AHASと命名した。

【0059】以上によりアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約3.4kbのDNA断片(EcoRI-SacI断片)を得ることができた。

【0060】実施例2

アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含む長さ約3.4kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118及びpUC119を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法)(Sahger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0061】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号:1に示す塩基配列を有する594個のアミノ酸をコードする1782の塩基対より構成されていた。

【0062】実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144(FERM BP-2515)から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0063】半合成培地A培地[尿素2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、K₂HPO₄ 0.5g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄ 0.5g、FeSO₄·7H₂O 6mg、MnSO₄·4~6H₂O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水11]11に、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液[25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mMのEDTA、50mMグルコース]20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液[0.2N NaOH、1%(W/V) SDS]40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液[5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液]30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0064】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した

後、遠心管に移し、室温下で5分間、 $15,000 \times g$ の遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、 -20°C で1時間静置後、 4°C で10分間、 $15,000 \times g$ の遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0065】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液〔トリス10mM、EDTA 1mM；HClにてpH8.0に調製〕2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液〔5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液〕15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を 1.392 g/ml に合わせた。この溶液を 12°C で42時間、 $116,000 \times g$ の遠心分離を行った。

【0066】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見い出される。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、 -20°C 1時間静置した。この溶液を $15,000 \times g$ の遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を $50\mu\text{g}$ 得た。

【0067】(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298（宝酒造製） $0.5\mu\text{g}$ に制限酵素SalI（5units）を 37°C 1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の $2\mu\text{g}$ に制限酵素XhoI（1unit）を 37°C で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0068】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために 65°C で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT₄ DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、 16°C で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル（宝酒造製）を形質転換した。

【0069】形質転換株は $30\mu\text{g/ml}$ （最終濃度）のカナマイシン、 $100\mu\text{g/ml}$ （最終濃度）のIPTG（イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド） $100\mu\text{g/ml}$ （最終濃度）のX-gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド）を含むL培地（トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1l、pH7.2）で 37°C にて24時間培養し、生育株として得られ

た。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法〔T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照〕により抽出した。

【0070】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0071】実施例4

プラスミドpCRY30-AHASの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG39-AHAS $5\mu\text{g}$ を制限酵素EcoRI、SacIを各5units用い、 37°C で1時間反応させ分解し、平滑末端処理したものと、EcoRIリンカー（宝酒造より市販） $1\mu\text{l}$ を混合し、50mMトリス緩衝液（pH7.6）、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT₄ DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、 12°C で15時間反応させ結合させた。

【0072】このDNAを制限酵素EcoRI 3unitsを用い 37°C で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 $1\mu\text{g}$ を制限酵素EcoRI 1unitを用い、 37°C で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液（pH7.6）、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT₄ DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、 12°C で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリJM1262株を形質転換し、カナマイシン $50\mu\text{g/ml}$ を含む選択培地〔K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.1g、グルコース20g、ロイシン20mg、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水1lに溶解〕に塗抹した。

【0073】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ3.4kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0074】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(272mM Sucrose、7mM KH_2PO_4 、1mM MgCl_2 ; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50 μ lとを混合し、水中にて20分間静置した。ジ

ーンパルサー(バイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25 μ FDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 μ g/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0075】

【表3】

表3 プラスミドpCRY30-AHAS

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
BamHI	1	12.0
EcoRI	2	8.6 3.4

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AHASと命名した。このプラスミドpCRY30-AHASの制限酵素切断点地図を図3に示す。

【0076】なお、プラスミドpCRY30-AHASにより形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-AHASは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成4年6月10日付で：微工研菌寄第12994号(FERM P-12994)として寄託されている。

【0077】実施例5

プラスミドpCRY30-AHASの安定性

前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株プレバクテリウム・フラバムMJ233-AHASを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15 μ g/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0078】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

【0079】実施例6

レーイソロシンの生産

培地(尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、 KH_2PO_4 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2ppm、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 2ppm、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2ppm、NaCl2ppm、ビオチン200 μ g/l、チアミン \cdot HCl100 μ g/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%)100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌(滅菌後pH7.0)した後プレバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*)MJ233-AHASを植菌し、無菌的にエタノールを2ml加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0080】次に、本培養培地(硫酸アンモニウム2.3%、 KH_2PO_4 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20ppm、ビオチン200 μ g/l、チアミン \cdot HCl100 μ g/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%)の1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、滅菌(120℃、20分間)後、エタノール20mlと前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて48時間培養を行った。

【0081】なお、エタノールは、培養中培地の濃度が2容量%を越えないように、約1~2時間ごと断続的に添加した。培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液[(NH_4) $_2$ SO $_4$ 2g/l; KH_2PO_4 0.5g/l; KH_2PO_4 0.5g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20ppm; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20ppm;チアミン塩酸塩100 μ g/l; α -ケト酪酸1.0%;pH7.6]の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2l容通気攪拌槽に仕込み、エタノール20ml及びビルビン酸ナトリウム10g/lを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて15時

間反応を行った。

【0082】反応終了後、遠心分離（4000rpm、15分間、4℃）にて除菌した上清液中のL-イソロイシンを定量した。その結果、上清液中のL-イソロイシン生成量は2.3g/lであった。この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂（H⁺型）のカラムに通してL-イソロイシンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、L-イソロイシン画分を濃縮し、冷エタノールでL-イソロイシンの結晶を析出させた。その結果、730mgのL-イソロイシン結晶が得られた。

【0083】また、比較例として、同様の条件にて、プレバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中のL-イソロイシンを定量した。その結果、上清液中のL-イソロイシン生成量は1.2g/lであった。

【0084】実施例7

L-バリンの生産

培地（尿素0.4%、硫酸1.4%、KH₂PO₄0.05%、K₂HPO₄0.05%、MgSO₄・7H₂O0.05%、CaCl₂・2H₂O2ppm、FeSO₄・7H₂O2ppm、MnSO₄・4~6H₂O2ppm、ZnSO₄・7H₂O2ppm、NaCl2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン塩酸塩100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌し、pH7に調節した後、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-AHASを植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0085】次に、本培養培地（グルコース5%、硫酸2.3%、KH₂PO₄0.05%、K₂HPO₄0.05%、MgSO₄・7H₂O0.05%、FeSO₄・7H₂O20ppm、MnSO₄・4~6H₂O20ppm、ビオチン200μg/l、チアミン塩酸塩100μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%）1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、滅菌（120℃、20分間）後、上記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vv

m、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0086】培養終了後、培養物100mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて二度洗浄した菌体を反応液（グルコース100g/l、KH₂PO₄0.05g/l、K₂HPO₄0.05g/l、MgSO₄・7H₂O0.5g/l、FeSO₄・7H₂O20ppm、MnSO₄・4~6H₂O20ppm、チアミン塩酸塩100μg/l、pH8.0）50mlに懸濁後、反応を実施した。

【0087】また、pH調整のため、乾熱滅菌（150℃、5時間加熱）した炭酸カルシウムを50g/lの濃度で添加した。反応は500mlの三角フラスコを用い、33℃、回転数220rpmにて40時間振とう反応を行った。反応終了後、遠心分離（4000rpm、15分間、4℃）にて除菌した上清液中のL-バリンを定量した。

【0088】その結果、上清中のL-バリンの生成量は2.0g/lであった。また、比較例として、同様の条件にて、プレバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中のL-バリンを定量した。その結果、上清液中のL-バリン生成量は0.8g/lであった。

【0089】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1785

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

菌株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1785

特徴を決定した方法：P

配列

```
ATG ACA GGT GCA CAG GCA ATT GTT CGA TCG CTC GAG GAG CTT AAC GCC 48
Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala
      1              5              10              15
GAC ATC GTG TTC GGT ATT CCT GGT GGT GCG GTG CTA CCG GTG TAT GAC 96
Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp
              20              25              30
CCG CTC TAT TCC TCC ACA AAG GTG GCG CAC GTC TTG GTG GCG CAC GAG 144
Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu
      35              40              45
```

CAG GGC GCA GGC CAC GCA GCA ACC GGC TAC GCG CAG GTT ACT GGA CGC 192
 Gln Gly Ala Gly His Ala Ala Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg
 50 55 60
 GTT GGC GTC TGC ATT GCA ACC TCT GGC CCA GGA GCA ACC AAC TTG GTT 240
 Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
 65 70 75 80
 ACC CCA ATC GCT GAT GCA AAC TTG GAC TCC GTT CCC ATG GTT GCC ATC 288
 Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile
 85 90 95
 ACC GGC CAG GTC GGA AGT GGC CTG CTG GGT ACC GAC GCT TTC CAG GAA 336
 Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu
 100 105 110
 GCC GAT ATC CGC GGC ATC ACC ATG CCA GTG ACC AAG CAC AAC TTC ATG 384
 Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met
 115 120 125
 GTC ACC GAC CCC AAC GAC ATT CCA CAG GCA TTG GCT GAG GCA TTC CAC 432
 Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His
 130 135 140
 CTC GCG ATT ACT GGT GCG CCT GGC CCT GTT CTG GTG GAT ATT CCT AAG 480
 Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys
 145 150 155 160
 GAT GTC CAG AAC GCT GAA TTG GAT TTC GTC TGG CCA CCA AAG ATC GAC 528
 Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp
 165 170 175
 CTG CCA GGC TAC CGC CCA GTT TCA ACA CCA CAT GCT CGC CAG ATC GAG 576
 Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu
 180 185 190
 CAG GCA GTC AAG CTG ATC GGT GAG GCC AAG AAG CCC GTC CTT TAC GTT 624
 Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Val
 195 200 205
 GGA GGC GGC GTT ATC AAG GCT GAC GCA CAC GAA GAG CTT CGT GCG TTC 672
 Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe
 210 215 220
 GCT GAG TAC ACC GGC ATC CCA GTT GTC ACC ACC TTG ATG GCT TTG GGT 720
 Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly
 225 230 235 240
 ACT TTC CCA GAG TCT CAC GAG CTG CAC ATG GGT ATG CCA GGC ATG CAT 768
 Thr Phe Pro Glu Ser His Glu Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His
 245 250 255
 GGC ACT GTG TCC GCT GTT GGT GCA CTG CAG CGC AGC GAC CTG CTG ATT 816
 Gly Thr Val Ser Ala Val Gly Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile
 260 265 270
 GCT ATC GGC TCC CGC TTT GAT GAC CGC GTC ACC GGT GAC GTT GAC ACC 864
 Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr
 275 280 285
 TTC GCG CCT GAC GCC AAG ATC ATT CAC GCC GAT ATT GAT CCT GCC GAA 912
 Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu
 290 295 300
 ATC GGA AAG ATC AAG CAG GTT GAG GTT CCA ATC GTG GGC GAT GCC CGC 960
 Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg

305 310 315 320
 GAA GTT CTT GCT CGT CTG CTG GAA ACC ACC AAG GCA AGC AAG GCA GAG 1008
 Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu
 325 330 335
 ACC GAG GAC ATC TCC GAG TGG GTT GAC TAC CTC AAG GGC CTC AAG GCA 1056
 Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala
 340 345 350
 CGT TTC CCA CGT GGC TAC GAC GAG CAG CCA GGC GAT CTG CTG GCA CCA 1104
 Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro
 355 360 365
 CAG TTT GTC ATT GAA ACC CTG TCC AAG GAA GTT GGC CCC GAC GCA ATT 1152
 Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile
 370 375 380
 TAC TGC GCC GGC GTC GGA CAG CAC CAA ATG TGG GCA GCT CAG TTC GTT 1200
 Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val
 385 390 395 400
 GAC TTT GAA AAG CCA CGC ACC TGG CTC AAC TCC GGT GGA CTG GGC ACC 1248
 Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr
 405 410 415
 ATG GGC TAC GCA GTT CCT GCG GCC CTT GGA GCA AAG GCT GGC GCA CCT 1296
 Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro
 420 425 430
 GAC AAG GAA GTC TGG GCT ATC GAC GGC GAC GGC TGT TTC CAG ATG ACC 1344
 Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr
 435 440 445
 AAC CAG GAA CTC ACC ACC GCC GCA GTT GAA GGT TTC CCC ATT AAG ATC 1392
 Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile
 450 455 460
 GCA CTA ATC AAC AAC GGA AAC CTG GGC ATG GTT CGC CAA TGG CAG ACC 1440
 Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr
 465 470 475 480
 CTA TTC TAT GAA GGA CGG TAC TCA AAT ACT AAA CTT CGT AAC CAG GGC 1488
 Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly
 485 490 495
 GAG TAC ATG CCC GAC TTT GTT GCC CTT TCT GAG GGA CTT GGC TGT GTT 1536
 Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val Ala Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val
 500 505 510
 GCC ATC CGC GTC ACC AAA GCG GAG GAA GTA CTG CCA GCC ATC CAA AAG 1584
 Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys
 515 520 525
 GCT CGA GAA ATC AAC GAC CGC CCA GTA GTC ATC GAC TTC ATC GTC GGT 1632
 Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly
 530 535 540
 GAA GAC GCA CAG GTA TGG CCA ATG GTG TCT GCT GGA TCA TCC AAC TCC 1680
 Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser
 545 550 555 560
 GAT ATC CAG TAC GCA CTC GGA TTG CGC CCA TTC TTT GAC GGC GAC GAA 1728
 Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu
 565 570 575
 TCA GCT GCA GAA GAC CCT GCA GAC ATT CAT GCT TCC GTT GAT TCG ACC 1776

Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala Asp Ile His Ala Ser Val Asp Ser Thr

580

585

590

GAG GCA TAA

1785

Glu Ala ***

【図面の簡単な説明】

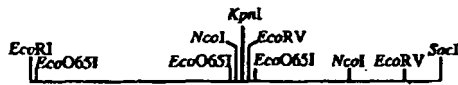
【図1】本発明のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約3.4 kbのDNA断片の制限酵素切断点地図。

【図2】大きさが約3.4 kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための戦略図。

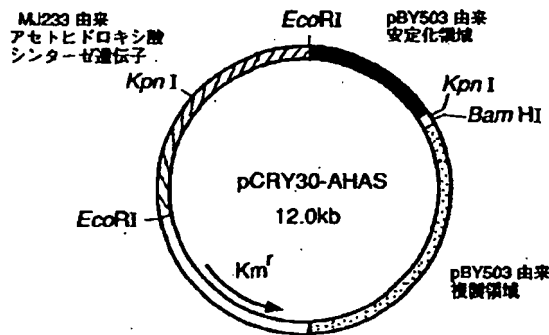
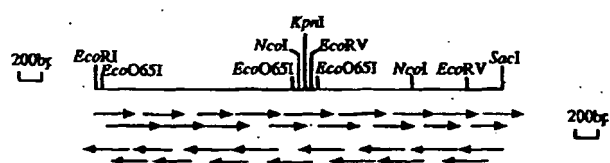
【図3】本発明のプラスミドpCRY30-AHASの制限酵素切断点地図。

【図1】

【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 N 15/60

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 13/06

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 13/08

C 1 2 R 1:38)